昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2018, 61(6): 686 – 697 doi:10.16380/j.kcxb.2018.06.007

日本弓背蚁颊下囊微生物的组成及多样性

张凯旋[1]，魏　琮[2]，南小宁[1]，王云果[1]，贺　虹[1,*]

（1. 西北农林科技大学林学院，陕西省林业综合重点实验室，陕西杨凌 712100；
2. 西北农林科技大学植物保护学院，陕西杨凌 712100）

摘要：【目的】本研究旨在调查日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 颊下囊中微生物(放线菌、细菌、真菌)组成、分布规律及细菌的多样性水平，以揭示其可能在蚂蚁食物利用、群体免疫等方面发挥的潜在功能。【方法】综合采用传统的微生物分离培养和 HiSeq 高通量测序方法，对在陕西杨凌采集获得的日本弓背蚁工蚁的颊下囊内含物、消化道、体表的微生物进行了分析比较。【结果】采用传统分离培养方法从日本弓背蚁工蚁颊下囊内含物分离到 10 株放线菌，其中 5 株为链霉菌属 *Streptomyces*，其平均分离频率达到 73.3% ~96.7%；分离到 7 株细菌，其中 4 株为芽孢杆菌 *Bacillus*，菌株 N-B1 和 N-B4 分离频率均达 70%以上；分离到 3 株真菌，其中菌株 P-F1(拟威克酵母菌属 *Wickerhamiella*)为优势类群，分离频率达 96.7%。从嗉囊、中肠及体表中分离到的菌株均可在颊下囊中发现，从颊下囊中分离到的菌株种类和菌落数量明显高于体表、嗉囊和中肠。HiSeq 高通量测序结果表明，颊下囊中的优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)，嗉囊和中肠的优势菌门为变形菌门和厚壁菌门；颊下囊和嗉囊样品中丰度较高的细菌类群明显高于中肠，中肠细菌组成相对较为简单；颊下囊中的优势属包括嗜果糖乳酸细菌属 *Fructobacillus*、杆菌属 *Bacterium*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingtomonas*；颊下囊中微生物物种丰度和多样性均高于嗉囊和中肠。【结论】日本弓背蚁工蚁颊下囊中普遍存在放线菌、芽孢杆菌和酵母菌及其他优势菌群，且微生物的丰度和多样性水平明显高于嗉囊和中肠，这些微生物在蚂蚁食物利用、营养物质消化以及群体免疫中的潜在功能有待于深入研究。

关键词：日本弓背蚁；颊下囊；消化道；微生物分离培养；HiSeq 高通量测序

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2018)06-0686-12

Composition and diversity of microbes in the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* (Hymenoptera: Formicidae)

ZHANG Kai-Xuan[1], WEI Cong[2], NAN Xiao-Ning[1], WANG Yun-Guo[1], HE Hong[1,*] (1. Key Laboratory of Comprehensive Forestry of Shaanxi Province, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】This study aims to investigate the microbe composition (actinomycetes, bacteria and fungi) and the diversity of bacteria in the infrabuccal pocket of the Japanese carpenter ant, *Camponotus japonicus*, so as to explore their potential functions in food utilization and population immunity. 【Methods】The culture-dependent method and HiSeq high-througput sequencing technique were combined to analyze the microbes in the infrabuccal pocket, digestive tract and cuticle of *C. japonicus*

基金项目：国家自然科学基金项目(31070342, 31570388)；林业公益性行业科研专项(201404302-4)

作者简介：张凯旋，女，1991 年 4 月生，河北石家庄人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态学，E-mail: zkxsjz@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hehong@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-11-21；接受日期 Accepted: 2018-01-17

workers collected in Yangling, Shaanxi, northwestern China.【Results】Ten actinobacterial strains were isolated from the infrabuccal pocket of *C. japonicus* workers, among which five strains belong to *Streptomyce* with the average isolation frequencies of 73.3% -96.7%. Seven bacterial strains were isolated and four of them were *Bacillus*, and the average isolation frequencies of the strains N-B1 and N-B4 were both above 70%. Three fungal strains were isolated, and the isolation frequency of the dominant strain P-F1 (*Wickerhamiella*) was up to 96.7%. All strains isolated from the crop, midgut and cuticle could be found in the infrabuccal pocket, and the species number of the strains and the number of microbial colonies isolated from the infrabuccal pocket were higher than those isolated from the cuticle, crop and midgut. The results of HiSeq high-throughput sequencing showed that the dominant bacterial groups in the infrabuccal pocket mainly belong to Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria, but in the crop and midgut the dominant bacterial groups belong to Proteobacteria and Firmicutes. The dominant genera with high abundance were more in the infrabuccal pockets and crops than in the midgut, and the bacterial composition in the midgut was relatively simple. The dominant genera in infrabuccal pocket included *Fructobacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Sphingtomonas*. The microbial abundance and diversity in the infrabuccal pocket were higher than those in the crop and midgut.【Conclusion】Actinomycetes, *Bacillus*, yeasts and other predominant microbes generally exist in the infrabuccal pocket of *C. japonicus*, and their abundance and diversity levels are significantly higher than those in the digestive tract (crop and midgut). The potential roles of these microorganisms in food utilization, nutrient digestion and population immunity of ants need to be further studied.

Key words: *Camponotus japonicus*; infrabuccal pocket; digestive tract; microbiological cultivation; HiSeq high-throughput sequencing

大部分蚂蚁通常是杂食性,它们既可以取食液体食物如花蜜、树木汁液以及同翅目昆虫的蜜露,又可采食固体食物如植物的种子、其他昆虫及小动物尸体(吴坚和王长禄, 1995)。但是其消化系统的解剖形态学研究表明,其口前腔特有的"颊下囊"(infrabuccal pocket)可对固体食物进行过滤并定期将其排出体外,因此只有液体食物才能进入觅食工蚁的食道并被储存于嗉囊,然后通过不同个体间的反哺(交哺)传送给群体内其他工蚁、幼虫和蚁后(Eisner and Happ, 1962; Hölldober and Wilson, 1990)。

Janet 最早于 1895 -1897 年期间对多种蚂蚁颊下囊结构和内含物成分进行了研究,并对其功能进行了初步推测(Bailey, 1920)。随后一些研究进一步验证了颊下囊具有过滤固体物质的功能(Eisner and Happ, 1962; Quinlan and Cherrett, 1978; Glancey *et al.*, 1981),并发现其在培养真菌的切叶蚁中发挥着特殊的作用,如新的建群蚁后利用颊下囊携带的原蚁巢真菌组织建立新的菌圃(Mueller *et al.*, 2001),工蚁则利用颊下囊收集菌圃中致病菌的孢子,并利用其中的链霉菌分泌抗生素杀死病菌孢子(Little *et al.*, 2003, 2006; Seipke *et al.*, 2012)。此外,从两种弓背蚁 *Camponotus* 的颊下囊中分离到一些细菌和酵母菌(Hansen *et al.*, 1999; Mankowski and Morrell, 2004),并在小家蚁 *Monomorium pharaonis* 头部发现连接有颊下囊的腺体(Eelen *et al.*, 2004)。但是截止目前对于颊下囊的研究仅局限于对少数几种蚂蚁的零星研究,还需更多的研究数据来揭示其在蚂蚁社会生活及取食行为中发挥的潜在功能。

日本弓背蚁 *C. japonicus* 广泛分布于中国各地,具有较大的蚁巢和个体数量,是多种林木害虫的天敌(吴坚和王常禄, 1995)。前期研究发现其消化道的细菌组成比较简单(He *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; 徐阳等, 2016),但其颊下囊中的细菌组成较为丰富,且放线菌为优势类群(张君等, 2016)。但这些细菌尤其是放线菌是否在不同个体蚂蚁的颊下囊中普遍分布,其他微生物如真菌的分布如何,都还未知。

因此,本研究继续采用传统的分离培养方法结合微生物 DNA 序列分析,对日本弓背蚁不同蚁巢工蚁单个个体颊下囊中的微生物(放线菌、细菌、真菌)进行分离培养,与其体表及消化道的微生物组成进行比较,在此基础上采用 HiSeq 高通量测序技

术对其内的细菌多样性进行了分析,旨在揭示该种蚂蚁颊下囊中微生物的组成特点及分布规律,为进一步研究这些微生物可能在蚂蚁取食、清洁及群体免疫等方面发挥的作用提供基本信息和理论依据。

1 材料与方法

1.1 蚂蚁的采集及解剖

2016 年 7 – 8 月,在陕西杨凌选择 3 个日本弓背蚁蚁巢(距离大于 3 km),分别用灭菌的镊子采集外出觅食的工蚁,将单头工蚁放于灭菌的离心管中,再置于冰盒中带回实验室。采集工蚁时单头单镊、单管,防止交叉污染。

解剖时,首先将蚂蚁置于 –20℃ 冰箱冷冻至昏迷(大概 10 ~ 15 min),取出后用无菌水清洗蚂蚁体表一次,以除去体表的土和其他附着物;将蚂蚁转入新的离心管,加入少许石英砂和 300 μL 无菌水,手摇震荡 2 min,取出蚂蚁,液体用于后续微生物的培养;在超净工作台内将体表清洁后的蚂蚁置于 75% 酒精中进行体表灭菌 1 min,再用 1 g/L 的升汞灭菌 45 s,之后用无菌水冲洗 5 次,放置于滤纸上吸干蚂蚁体表的水份。最后在双目解剖镜下分别解剖出蚂蚁头部的颊下囊及其内含物、腹部的嗉囊和中肠。解剖过程必须保证各个部位的完整,确保不相互污染。

1.2 放线菌、细菌和真菌的分离培养

利用平皿涂抹法进行微生物的分离培养(段佳丽等, 2015)。放线菌和真菌的分离培养采用高氏一号和马铃薯葡萄糖(PDA)培养基,将解剖获得的单头蚂蚁的颊下囊、嗉囊、中肠分别放入相应的培养基上,然后加入 300 μL 无菌水涂抹均匀;300 μL 体表处理液直接接种进行培养。细菌的分离培养采用牛肉膏蛋白胨培养基,将单个颊下囊、嗉囊、中肠置于 1.5 mL 离心管中,加 300 μL 无菌水研磨,然后将样品分别稀释 10 倍后,再各吸取 300 μL 接种。均另涂 300 μL 无菌水作为对照。每种培养基完成 30 头工蚁的颊下囊、嗉囊、中肠、体表的微生物培养。

将制作好的培养皿用封口膜封好,倒置放于恒温培养箱中 28℃ 培养,高氏一号培养基培养 15 ~ 21 d,牛肉膏蛋白胨和马铃薯葡萄糖培养基培养 2 ~ 4 d。记录每个平板上的菌落形态及数量。根据菌落形态特征挑取单菌落,进行划线培养,分离纯化后置于 4℃ 保藏、备用。

1.3 微生物的分子鉴定及序列分析

采用 CTAB 法提取放线菌、细菌、真菌菌株的总 DNA (Moran *et al.*, 1993; 徐丽华等, 2007)。放线菌和细菌采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) 和 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) 进行 PCR 扩增 (Li *et al.*, 2012)。真菌采用通用引物 ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) 和 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) 进行 PCR 扩增 (Pryce *et al.*, 2003)。PCR 扩增体系: 10 × PCR 缓冲液 5 μL, dNTP (1 mmol/L) 2.5 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, DNA 模板 1 μL, ddH_2O 补充体积至 25 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 1 min, 25 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,达到测序的浓度和纯度后送奥科鼎盛生物公司进行测序。

将获得的菌株 DNA 序列进行人工校对后,在 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列比对,下载相似性最高的相关微生物序列,然后利用 ClustalX 2.1 软件进行多重比对 (Larkin *et al.*, 2007), 并采用 MEGA 6.0 软件基于最理想的建树模型构建最大似然系统发育树 (maximum likelihood tree) (Tamura *et al.*, 2011)。相关菌株的 DNA 序列已上传 GenBank, 序列号为 MF175086 – MF175102。

1.4 HiSeq 高通量测序

为了进一步揭示日本弓背蚁颊下囊中细菌的组成及多样性水平,我们采用高通量测序方法对其颊下囊、嗉囊、中肠、头部(摘除颊下囊)、胸部和腹部(摘除嗉囊和中肠)进行分析。所有蚂蚁采自于同一个蚁巢,每个样品包含 8 个工蚁的颊下囊/嗉囊/中肠/头部(摘除颊下囊)/胸部/腹部(摘除嗉囊和中肠),混合后作为一个样品进行分析,每个样品 3 个重复,共 18 个样品。采用 TIANamp Bacteria DNA Kit DP302-02 (TIANGEN, 北京) 试剂盒提取细菌总 DNA,然后将样品送北京百迈克生物科技有限公司进行样品浓度、纯度等质量检测,并对符合要求的样品在 Illumina HiSeq 2500 测序平台上进行 16S rDNA V3 和 V4 可变区的高通量测序。

采用 FLASH v1.2.7, Trimmomatic v0.33 和 UCHIME v4.2 等软件将 HiSeq 测序得到的双端序列数据拼接 (merge) 成一条序列 Tags, 同时对 Reads 的质量和拼接的效果进行质控过滤。使用 QIIME (version 1.8.0) 软件中的 UCLUST 对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU, 并基于 Silva

(细菌)分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。使用 Mothur(version v. 1.30)软件对样品 Alpha 多样性指数(Chao1, Ace, Shannon 和 Simpson)进行分析。

2 结果

2.1 从日本弓背蚁工蚁颊下囊中分离到的微生物种类及其分布

利用3种培养基,从日本弓背蚁3个蚁巢30头工蚁颊下囊中共分离到20种不同形态的菌落,对其进行分子鉴定,并将其DNA序列在NCBI数据库中进行BlAST比对(表1),然后构建ML系统进化树(图1和2),确定它们属于放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、γ-变形菌门(γ-Proteobacteria)、子囊菌亚门(Ascomycotina)和半知菌亚门(Deuteromycotina)。

利用高氏一号培养基分离到10株放线菌。菌株G-A1, G-A2, G-A3, G-A4和G-A5属于链霉菌属 *Streptomyces*,在3个蚁巢中均可分离到,平均分离频率分别为96.7%, 73.3%, 80.0%, 86.7%和80.0%。菌株G-A6和G-A7为冢村氏菌属 *Tsukamurella*,菌株N-A8为束丝放线菌属 *Actinosynnema*,菌株N-A9为诺卡氏菌属 *Nocardioidaceae*,菌株N-A10为短小杆菌属 *Curtobacterium*,分离频率均较低,分别为30.0%, 46.7%, 36.7%, 3.3%和16.7%。

表1 日本弓背蚁工蚁颊下囊中微生物的分离鉴定

Table 1 Isolation and identification of microbes from the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* workers

菌株编号 Strain code	Blast结果中一致性最高的菌株(GenBank登录号)(一致性) BLAST with the highest identity (GenBank accession no.) (Identity)	颊下囊中微生物的平均菌落数* Average number of microbial colonies in infrabuccal pocket			平均分离频率 Average isolation frequency (%)
		巢1 Nest 1	巢2 Nest 2	巢3 Nest 3	
放线菌门 Actinobacteria					
G-A1	链霉菌属 *Streptomyces* sp. (AY154479.1)(99%)	8.9±5.4	15.1±13.1	13.0±10.3	96.7
G-A2	链霉菌属 *Streptomyces* sp. (KX279567.1)(99%)	3.5±3.4	2.6±2.1	3.8±3.4	73.3
G-A3	链霉菌属 *Streptomyces* sp. (GU263884.1)(99%)	2.4±3.6	2.2±1.4	3.0±1.8	80.0
G-A4	链霉菌属 *Streptomyces* sp. (KU714908.1)(99%)	4.8±4.3	6.0±4.4	5.2±4.4	86.7
G-A5	链霉菌属 *Streptomyces* sp. (KU382322.1)(99%)	2.4±2.1	6.2±5.5	7.4±5.5	80.0
G-A6	冢村氏菌属 *Tsukamurella* sp. (KU382731.1)(99%)	2.0±1.3	/	/	30.0
G-A7	冢村氏菌属 *Tsukamurella* sp. (JN695025.1)(99%)	1.0±1.3	5.4±6.4	1.6±2.6	46.7
N-A8	束丝放线菌属 *Actinosynnema* sp. (KP720610.1)(99%)	4.0±5.2	3.0±4.8	5.0±7.1	36.7
N-A9	诺卡氏菌属 *Nocardioides* sp. (JN180171.1)(99%)	/	/	1.0±3.2	3.3
N-A10	短小杆菌属 *Curtobacterium* sp. (KP279888.1)(99%)	/	/	13.0±17.0	16.7
厚壁菌门 Firmicutes					
N-B1	芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. (KU851836.1)(99%)	244.0±193.9	176.0±131.1	175.0±149.8	83.3
N-B3	苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (KR708919.1) (99%)	/	114.0±91.7	/	33.3
N-B4	芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. (KT964809.1)(99%)	62.0±37.4	47.0±41.9	66.0±54.4	76.7
N-B5	芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. (KY848236.1)(99%)	/	/	32.0±41.3	20.0
变形菌门 γ-Proteobacteria					
N-B6	醋杆菌属 *Acetobacter* sp. (KF924238.1)(99%)	/	/	119.0±90.1	30.0
N-B7	鞘脂单胞菌属 *Methylobacterium* sp. (LC094649.1)(99%)	24.0±23.7	20.0±22.1	10.0±13.3	66.7
N-B2	甲基杆菌属 *Sphingomonas* sp. (JQ659496.1)(99%)	/	/	134.0±69.6	33.3
子囊菌亚门 Ascomycotina					
P-F1	拟威克酵母菌属 *Wickerhamiella* sp. (KM246829.1)(97%)	12.2±6.7	10.8±7.0	11.4±5.2	96.7
P-F3	青霉属 *Penicillium* sp. (KU556504.1)(99%)	0.2±0.4	0.6±0.8	0.4±0.8	26.7
半知菌亚门 Deuteromycotina					
P-F2	枝孢属 *Cladosporium* sp. (HQ846579.1)(99%)	0.6±0.7	0.6±0.7	0.2±0.6	40.0

* 数据为平均值±标准差 The data are represented as mean ± *SD*. /: 未分离到 Not isolated. 表2同 The same for Table 2.

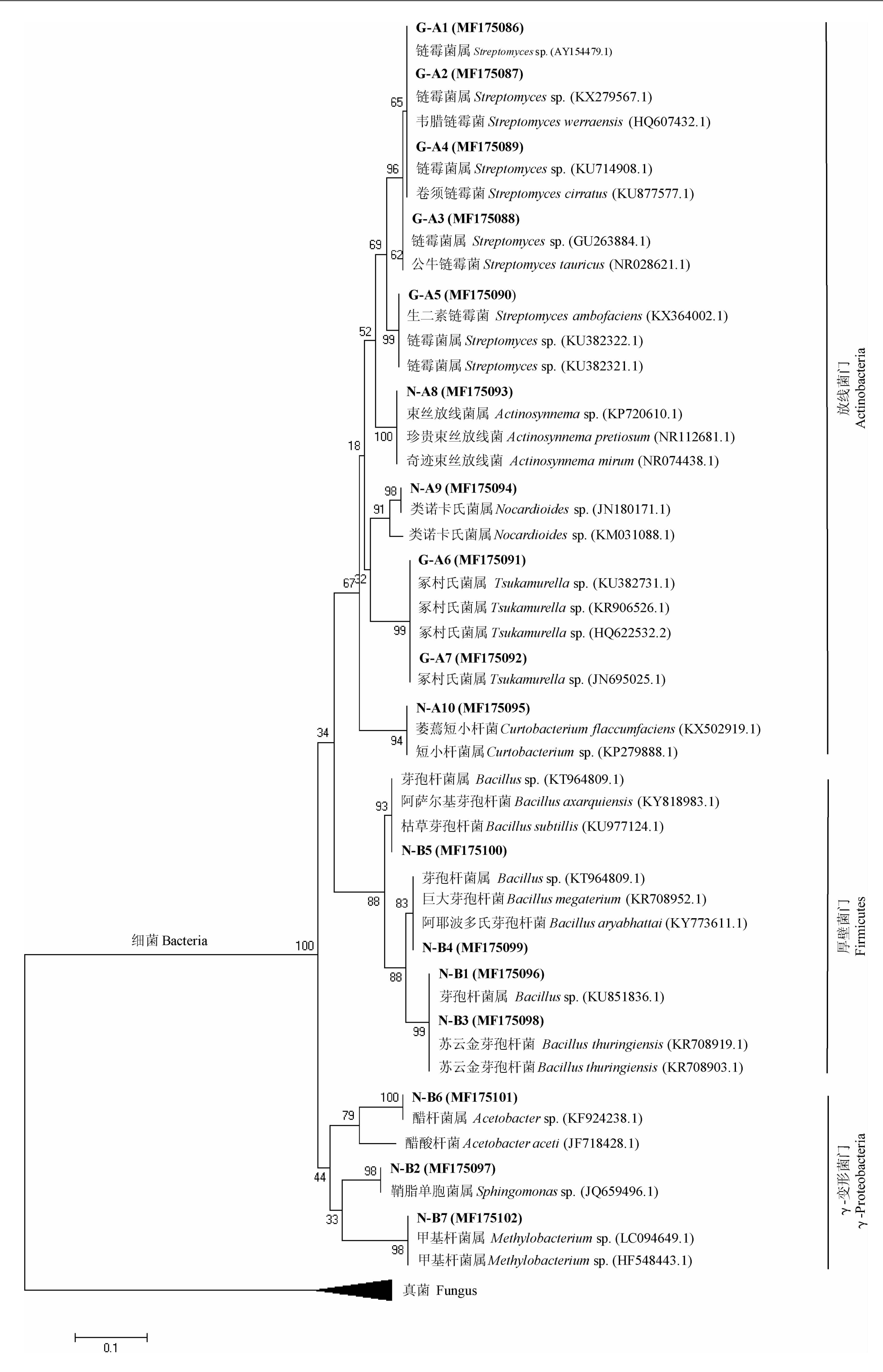


图 1　日本弓背蚁工蚁颊下囊中可分离培养细菌的系统发育分析

Fig. 1　Phylogenetic analysis of culturable bacteria isolated from the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* workers

采用软件 MEGA 6.0 中的最大似然法构建而得的系统发育树,模型为 N-J,自展值为 1 000;标尺 0.1 表示核苷酸位点的平均替代数。图 2 同。

The phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood method with 1 000 bootstraps and N-J model on MEGA6.0 software. The scale bar represents 0.1 substitution per nucleotide position. The same for Fig. 2.

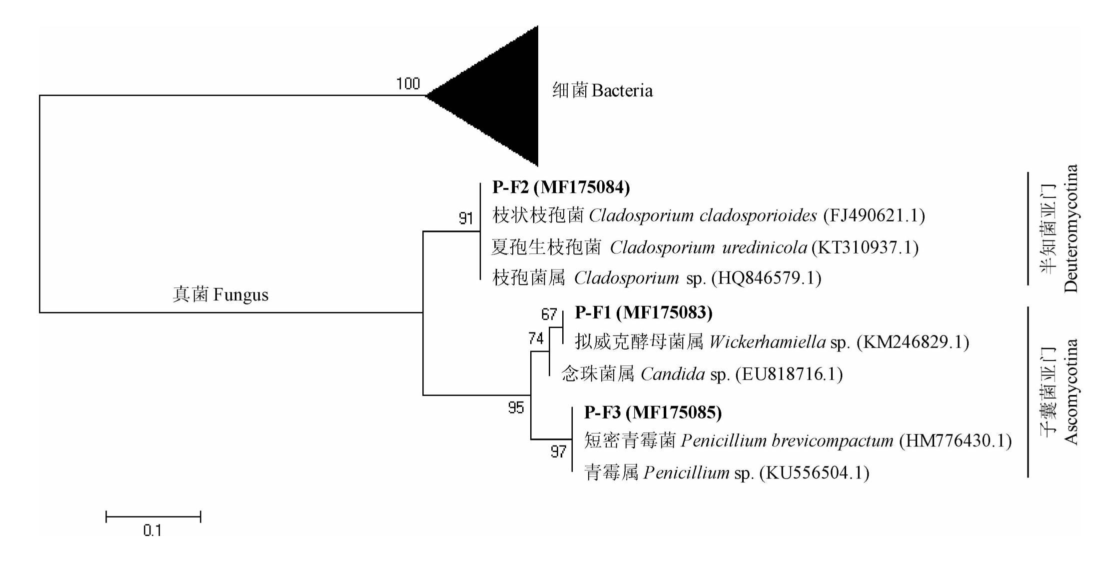


图 2　日本弓背蚁工蚁颊下囊中可分离培养真菌的系统发育分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of culturable fungi isolated from the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* workers

利用牛肉膏蛋白胨培养基分离到 7 株细菌。菌株 N-B1，N-B3，N-B4 和 N-B5 属于芽孢杆菌属 *Bacillus*，为优势类群；其中菌株 N-B1 和 N-B4 在 3 个蚁巢均可分离到，平均分离频率分别为 83.3% 和 76.7%。N-B7 为鞘脂单胞菌属 *Methylobacterium*，在 3 个蚁巢均有分布，平均分离频率为 66.7%。N-B6 为醋杆菌属 *Acetobacter*，N-B2 为甲基杆菌属 *Sphingomonas*，仅在巢 3 中分布，平均分离频率分别为 30.0% 和 33.3%。

从马铃薯葡萄糖培养基上分离到 3 株真菌，在 3 个蚁巢中均有分布，其中菌株 P-F1 为拟威克酵母菌属 *Wickerhamiella*，分离频率达 96.7%；菌株 P-F2 为枝孢属 *Cladosporium*，菌株 P-F3 为青霉属 *Penicillium*，分离频率分别为 40.0% 和 26.7%。

2.2　从日本弓背蚁工蚁颊下囊、体表及消化道分离的微生物的比较

为了比较颊下囊中微生物与其体表和消化道微生物组成的差异，亦对工蚁的体表、嗉囊和中肠的微生物进行了分离培养（表 2），结果表明：从工蚁体表共分离到 8 株放线菌、7 株细菌和 3 株真菌；从嗉囊分离到 2 株放线菌、5 株细菌和 3 株真菌；从中肠分离到 1 株放线菌、5 株细菌和 1 株真菌。与颊下囊中的分离结果（10 株放线菌，7 株细菌，3 株真菌）相比较，发现从嗉囊、中肠及体表中分离到的菌株均可在颊下囊中发现，体表分离到的微生物种类和数量少于颊下囊，但明显高于嗉囊和中肠。

从颊下囊中分离到的优势菌群链霉菌 *Streptomyces*（G-A1，G-A2，G-A3，G-A4 和 G-A5 菌株）在嗉囊和中肠中没有发现，而都在体表中分离到，但其菌落数量均低于颊下囊；菌株 G-A6 和 N-A8 未在嗉囊、中肠和体表中分离到。颊下囊中的优势细菌芽孢杆菌 *Bacillus* N-B1 和 N-B4 菌株亦是工蚁消化道内的优势细菌，在嗉囊、中肠及体表中均分离到，但其菌落数量明显低于颊下囊；N-B3 仅分布于颊下囊和体表。N-B7 在颊下囊、嗉囊、中肠和体表均可分离到，N-B5，N-B6 和 N-B2 零星分布。颊下囊中分离频率较高的真菌菌株 P-F1（拟威克酵母菌属 *Wickerhamiella*），也从嗉囊、中肠及体表中分离到，但平均菌落数量低于颊下囊。在颊下囊中的分离频率较低的菌株 P-F2（枝孢属 *Cladosporium*）和 P-F3（青霉属 *Penicillium*），仅在个别工蚁的嗉囊及体表中分离到，但在中肠中没有发现。

2.3　基于高通量测序的日本弓背蚁细菌组成及多样性水平

从日本弓背蚁工蚁颊下囊、嗉囊、中肠、头部（无颊下囊）、胸部、腹部（无嗉囊和中肠）18 个样品中共获得 1 069 773 条高质量的细菌 16S rRNA 序列，依据 97% 序列相似性归类为 629 个 OTUs，总共注释到 20 门，45 纲，70 目，130 科，226 属（表 3）。属平均数目趋势为：颊下囊（175 个）> 嗉囊（106 个）> 中肠（52 个），胸部（140 个）> 头部（无颊下囊）（106 个）> 腹部（无嗉囊和中肠）（81 个）。在以下描述中，头部（无颊下囊）均是指摘除颊下囊的样品，腹部（无嗉囊和中肠）都是指摘除嗉囊和中肠的样品。

2.3.1　不同组织样品中细菌的种类组成：细菌组成分析结果表明：在门水平（图 3：A），变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）和放线菌门（Actinobacteria）是大部分样品中的优势类群，只是

表 2 日本弓背蚁工蚁颊下囊、体表和消化道中可分离培养微生物的分布比较

Table 2 Comparison of the distribution of the microorganisms isolated from the infrabuccal pocket, cuticle and digestive tract of *Camponotus japonicus* workers

菌株编号 Strain code	嗉囊、中肠及体表微生物的平均菌落数 Average number of microbial colonies in the crop, midgut and cuticle								
	嗉囊 Crop			中肠 Midgut			体表 Cuticle		
	巢 1 Nest 1	巢 2 Nest 2	巢 3 Nest 3	巢 1 Nest 1	巢 2 Nest 2	巢 3 Nest 3	巢 1 Nest 1	巢 2 Nest 2	巢 3 Nest 3
放线菌门 Actinobacteria									
G-A1	/	/	/	/	/	/	1.9±1.9	7.3±4.7	4.9±4.1
G-A2	/	/	/	/	/	/	1.4±1.9	1.3±1.8	1.4±1.6
G-A3	/	/	/	/	/	/	1.1±1.5	0.9±1.3	1.3±1.2
G-A4	/	/	/	/	/	/	0.9±2.9	2.1±3.8	1.0±3.2
G-A5	/	/	/	/	/	/	1.3±2.8	1.9±3.1	1.3±2.2
G-A6	/	/	/	/	/	/	/	/	/
G-A7	/	/	/	/	/	/	/	/	11.2±8.8
N-A8	/	/	/	/	/	/	/	/	/
N-A9	/	/	10.0±7.4	4.0±5.2	5.0±7.1	3.0±4.8	2.0±4.2	1.0±3.2	1.0±3.2
N-A10	/	/	4.0±5.2	/	/	/	1.0±3.2	2.0±4.2	/
厚壁菌门 Firmicutes									
N-B1	62.0±59.8	92.0±69.2	29.0±24.9	18.0±29.4	13.0±18.3	25.0±25.9	100.0±87.4	29.0±51.3	45.0±53.3
N-B3	/	/	/	/	/	/	16.0±35.0	49.0±84.0	40.0±67.2
N-B4	23.0±21.6	1.5±2.6	15.0±17.8	32.0±31.6	54.0±76.0	73.0±53.3	/	/	108.0±122.9
N-B5	/	/	33.0±33.0	/	31.0±28.5	/	/	44.0±53.4	/
变形菌门 γ-Proteobacteria									
N-B6	/	/	/	/	/	28.0±35.8	/	32.0±44.7	/
N-B7	12.0±16.2	19.0±19.1	18.0±7.90	49.0±49.5	/	25.0±35.4	8.0±25.3	4.0±12.6	5.0±15.8
N-B2	/	/	33.0±24.9	/	/	/	39.0±44.5	/	/
子囊菌亚门 Ascomycotina									
P-F1	2.5±1.7	0.6±0.8	2.0±2.0	1.8±2.4	1.0±1.5	2.7±2.5	2.7±2.7	0.9±1.5	10.8±5.7
P-F3	0.1±0.3	0.1±0.3	/	/	/	/	1.2±0.9	0.6±0.8	0.7±1.0
半知菌亚门 Deuteromycotina									
P-F2	0.2±0.4	/	/	/	/	/	0.7±0.8	2.0±1.3	/

表 3 日本弓背蚁工蚁不同组织样品中细菌高通量测序结果的 OTU 数目及其分类水平统计

Table 3 Statistics of the OTUs number and classification levels based on the high-throughput sequencing of bacteria associated with different tissues of *Camponotus japonicus* workers

样本 Samples		有效 reads 数目(条) Number of valid reads	OTU 数目(个) Number of OTUs	不同分类阶元归类数目(个) Number of different taxonomic categories				
				门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
颊下囊 Infrabuccal pocket	a1	61 484	393	17	35	59	105	163
	a2	53 049	386	16	31	52	101	161
	a3	60 881	509	17	38	64	120	201
嗉囊 Crop	b1	61 973	135	13	22	37	57	69
	b2	59 505	259	14	27	44	79	113
	b3	62 644	290	15	31	50	90	136
中肠 Midgut	c1	62 264	70	7	11	22	33	40
	c2	62 517	141	13	26	37	56	74
	c3	62 533	81	8	12	23	35	42
头部(无颊下囊)	d1	61 831	168	13	27	41	69	86
Head with infrabuccal	d2	61 622	263	16	30	51	87	130
pocket removed	d3	62 523	210	16	31	47	78	104
胸部 Thorax	e1	26 604	173	11	25	44	70	84
	e2	62 068	371	17	36	60	102	158
	e3	61 453	416	17	40	62	112	179
腹部(无嗉囊和中肠)	f1	62 926	116	7	15	30	48	67
Abdomen with crop and	f2	62 289	125	12	27	40	62	69
midgut removed	f3	61 607	215	15	31	49	78	107
总数 Total		1 069 773	629	20	45	70	130	226

丰度存在不同程度的变化。不同组织中，变形菌门丰度为：颊下囊 45.0% ~73.2%，嗉囊 53.7% ~85.2%，中肠 81.5% ~91.4%，头部（无颊下囊）8.2% ~75.6%，胸部 54.6% ~85.4%，腹部（无嗉囊和中肠）97.4% ~98.0%，在腹部和中肠的丰度明显高于其他组织；厚壁菌门丰度为：颊下囊 22.6% ~

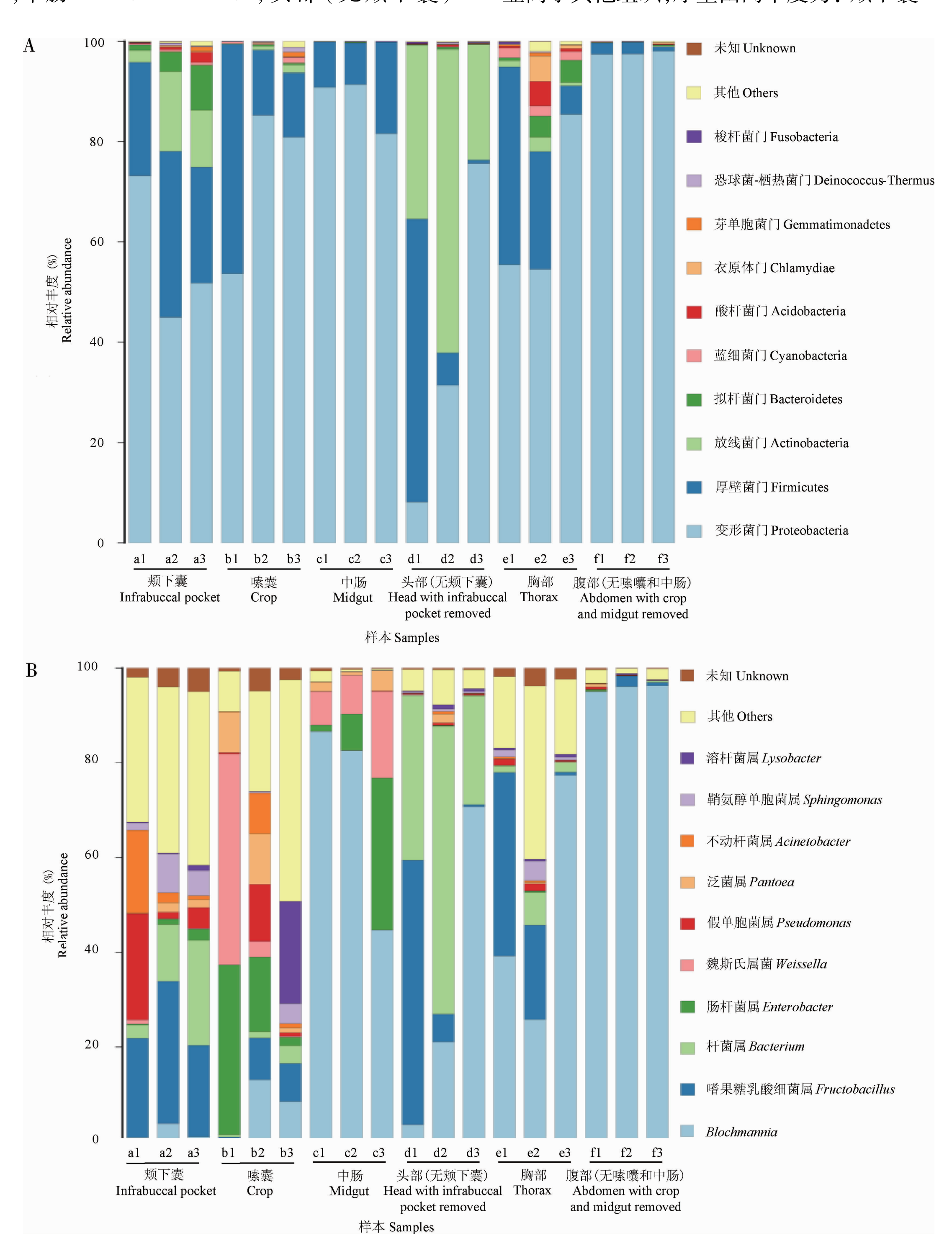


图 3　日本弓背蚁工蚁不同组织细菌门（A）和属（B）水平群落组成

Fig. 3　Bacterial community composition in different tissues of *Camponutus japonicus* workers at the phylum (A) and genus (B) levels

柱状图只显示丰度水平前十的物种，并将其他物种合并为 Others 在图中显示，Unknown 代表未得到分类学注释的物种。The histogram only displays the top ten species in abundance level, and the rest were merged into others. Besides, unknown represents the species without taxonomic annotation.

33.1%，嗉囊 12.8% ~45.7%，中肠 8.3% ~18.3%，头部（无颊下囊）0.7% ~56.3%，胸部 5.6% ~39.5%，腹部（无嗉囊和中肠）0.9% ~2.4%；放线菌门丰度为：颊下囊 2.4% ~15.9%，嗉囊 0.16% ~1.60%，中肠 0.04% ~0.05%，头部（无颊下囊）22.9% ~60.4%，胸部 0.65% ~2.83%，腹部（无嗉囊和中肠）0.06% ~0.21%，在头部和颊下囊的丰度高于其他组织；拟杆菌门（Bacteroidetes）仅在颊下囊（1.2% ~8.9%）和胸部（0.55% ~4.45%）中的丰度较高。

在属水平，通过比较丰度位于前 10 的属（其他丰度较低的属合并于 others）可以看出（图 3：B），颊下囊和嗉囊样品中丰度较高的属最多，而头部（无颊下囊）、中肠、胸部和腹部（无嗉囊和中肠）的属组成相对较为简单。颊下囊中的优势属包括嗜果糖乳酸细菌属 *Fructobacillus*（19.2% ~30.0%）、杆菌属 *Bacterium*（2.83% ~22.23%）、假单胞菌属 *Pseudomonas*（1.31%~22.38%）、不动杆菌属 *Acinetobacter*（0.85% ~17.48%）和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingtomonas*（1.57% ~8.14%）。嗉囊中 3 个样品中优势菌属的丰度差异较大，主要类群包括弓背蚁属蚂蚁的内共生菌 *Blochmannia*（0.70% ~13.15%）、肠杆菌属 *Enterobacter*（1.80% ~35.83%）、嗜果糖乳酸细菌属（0.35% ~8.81%）、魏斯氏属菌（0.22% ~44.46%）和杆菌属（0.51% ~3.67%）。中肠的细菌主要由 *Blochmannia*（44.73% ~86.64%）组成，还有部分肠杆菌属（1.25% ~32.07%）、魏斯氏属菌（7.14% ~18.20%）和泛菌属 *Pantoea*（0.77% ~4.36%）。头部（无颊下囊）和胸部的优势菌群基本相同，包括 *Blochmannia* 头部（无颊下囊）3.66% ~70.76%，胸部 25.84% ~77.37%、杆菌属头部（无颊下囊）22.99% ~60.80%，胸部 1.41% ~6.92% 和嗜果糖乳酸细菌属头部（无颊下囊）0.46% ~55.81%，胸部 0.66% ~38.71%。腹部（无嗉囊和中肠）的优势菌为 *Blochmannia* 95.01% ~96.30%。

放线菌门的细菌属主要分布于头部（无颊下囊）和颊下囊中，由于它们的丰度较低，均被合并至 others 中，其中包括链霉菌 *Streptomyces*、束村氏菌 *Tsukamurella*、类诺卡氏菌 *Nocardioides*、诺卡氏菌 *Nocardia*、微杆菌属 *Microbacterium*、分支杆菌属 *Mycobacterium* 等。

2.3.2 不同组织样品中细菌的多样性分析：细菌 Alpha 多样性分析结果表明（表 4）：颊下囊样品的 Ace，Chao1 和 Shannon 指数最高，而 Simpson 指数最小，表明颊下囊中微生物物种丰度和多样性最高，但优势类群不集中；嗉囊和胸部的物种丰度和多样性次之；中肠和腹部（无嗉囊和中肠）样品 Ace 和 Chao1 物种丰度和 Shannon 指数最低，但它们的 Simpson 指数高于其他部位，说明该部位物种多样性较低，但优势种的集中程度较高。各样本文库的覆盖率均高于 0.99，表明所有样本的测序结果已较全面地反映了样本中微生物的真实情况。

表 4 日本弓背蚁工蚁不同组织中细菌 alpha 多样性分析

Table 4 Alpha diversity analysis among different tissues of *Camponotus japonicus* workers

样本 Samples	多样性指数 Diversity index				样本文库的覆盖率 Coverage of sample libraries
	Ace	Chao1	Shannon	Simpson	
颊下囊 Infrabuccal pocket	441 ±68	446 ±70	3.91 ±0.83	0.08 ±0.03	0.9995
嗉囊 Crop	340 ±10	289 ±66	2.40 ±0.36	0.16 ±0.16	0.9987
中肠 Midgut	209 ±78	161 ±58	0.85 ±0.34	0.60 ±0.23	0.9993
头部（无颊下囊） Head with infrabuccal pocket removed	225 ±47	231 ±49	1.56 ±0.42	0.38 ±0.15	0.9996
胸部 Thorax	338 ±145	341 ±147	2.42 ±1.12	0.34 ±0.25	0.9993
腹部（无嗉囊和中肠） Abdomen with crop and midgut removed	207 ±47	181 ±44	0.30 ±0.05	0.92 ±0.12	0.9993

数据表示均为平均值 ± 标准差。The data are represented as mean ± *SD*.

3 讨论

本研究采用传统的微生物分离培养和高通量测序方法，对我国广泛分布的日本弓背蚁颊下囊中的微生物进行了研究。利用 3 种常用培养基对工蚁颊下囊中细菌、放线菌和真菌进行了分离培养，结果发现链霉菌、芽孢杆菌和拟威克酵母菌为优势类群，它们在不同蚁巢不同工蚁个体的颊下囊中普遍存在，是颊下囊中的常驻菌群。同时，从颊下囊中分离到

的微生物种类和数量明显高于体表及消化道（嗉囊、中肠），HiSeq 高通量测序分析结果也进一步显示工蚁颊下囊中存在明显的优势菌群，其细菌物种丰度和多样性指数显著高于嗉囊和中肠。两种方法的研究结果虽存在明显的差异，但从不同侧面揭示了颊下囊中微生物的分布特点。

本研究发现链霉菌是颊下囊中的优势放线菌类群，这与张君等（2016）的研究结果一致，但本研究进一步发现分离到的 10 株放线菌中有 5 株（菌株 G-A1，G-A2，G-A3，G-A4 和 G-A5）属于链霉菌，其分离频率为 73.3% ~96.7%，在 3 个蚁巢中均有分布，其他放线菌如冢村氏菌属、束丝放线菌属、诺卡氏菌属和短小杆菌属的分离频率较低，并且仅在个别蚁巢中分离到。同时，本研究获得的高通量数据也进一步明确放线菌主要分布于日本弓背蚁的头部和颊下囊，也与郭丽枫（2016）对日本弓背蚁体上放线菌的分离结果一致，其发现从头部分离到的放线菌种类多于胸部和腹部。链霉菌已在 Attini 族切叶蚁中发挥重要作用，如工蚁颊下囊中的链霉菌能够产生抗生素，可杀死菌圃中致病菌的孢子（Little *et al*., 2006）；*Allomerus* 蚂蚁表皮分布的链霉菌也对菌圃中的其他杂菌具有抑制作用（Seipke *et al*., 2012）。此外，一些新的放线菌种类也陆续从蚂蚁身体上分离到（Yu *et al*., 2013；Bai *et al*., 2016；Han *et al*., 2016；Liu *et al*., 2016）。这些研究均表明蚂蚁身体上蕴藏着丰富的放线菌资源，它们在蚂蚁的群体免疫中发挥重要的作用，并可能存在互利共生关系。

芽孢杆菌是日本弓背蚁消化道中可分离培养的优势菌群（Li *et al*., 2012；朱卓琳等，2015；张君等，2016），本研究从颊下囊中分离到 7 株细菌中有 4 株属于芽孢杆菌，其中菌株 N-B1 和 N-B4 在 3 个蚁巢均可分离到，平均分离频率分别为 83.3% 和 76.7%。Hansen 等（1999）在莫多克弓背蚁 *Camponotus modoc* 颊下囊中也分离到芽孢杆菌，推测该类微生物可以帮助寄主蚂蚁获得氨基酸和必需的维生素，或者可能对于一些留存于颊下囊中的较大颗粒物质起消化作用。关于该类细菌在颊下囊和蚂蚁消化道中的潜在功能还有待于进一步的实验验证。

拟威克酵母菌 *Wickerhamiella* 是从日本弓背蚁的颊下囊分离到的优势真菌，其分离频率高达 96.7%，而且张君（2016）从颊下囊的超微结构中也发现酵母菌孢子分布于颊下囊的内壁。许多学者已从几种切叶蚁的体表、颊下囊和菌圃分离到一些酵母菌，发现一些菌株可以抑制菌圃寄生菌 *Escovopsis* 和昆虫病原菌球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌丝的生长（Carreiro *et al*., 1997；Pagnocca *et al*., 2008；Rodrigues *et al*., 2009），邻小弓背蚁 *Camponotus vicinus* 蚂蚁可能利用颊下囊中的酵母菌作为营养物质或帮助消化代谢的酶类（Mankowski and Morrell，2004）。此外，拟威克酵母菌可产生次级代谢产物槐糖脂，具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等生物功能（申靖，2012），我们推测拟威克酵母菌可能在颊下囊内发挥类似的功能。

此外，HiSeq 高通量测序分析结果也显示颊下囊中的细菌物种丰度和多样性均高于嗉囊和中肠，颊下囊和嗉囊中的优势菌属较多，其中嗜果糖乳酸细菌 *Fructobacillus* 在颊下囊和嗉囊中均有分布，前期也曾从日本弓背蚁的消化道（嗉囊、中肠和后肠）中检测到该种细菌（He *et al*., 2011；Li *et al*., 2012）。嗜果糖乳酸细菌属于乳杆菌目（Lactobacillales）明串珠菌科（Leuconostocaceae），是一类乳酸菌，具有特殊的生理活性和营养功能，大部分是动物体内重要的生理功能菌群，我们推测该菌的存在应该与日本弓背蚁喜食蚜虫蜜露有关，可能在喜食蚜虫蜜露的蚂蚁类群中广泛存在，帮助蚂蚁利用蜜露中的糖分。*Blochmannia* 是弓背蚁属蚂蚁特有的内共生菌，前期的研究发现它主要分布于中肠的肠壁细胞（Schröder *et al*., 1996），在纤弱弓背蚁 *C. fragilis* 的嗉囊中也检测到（He *et al*., 2014）。但本研究高通量测序分析结果显示它不仅分布于中肠、嗉囊，而且分布于颊下囊、头部不包括颊下囊的其他部位、胸部以及腹部不包括嗉囊和中肠的其他部位，这是否意味着 *Blochmannia* 在日本弓背蚁体内存在某种未知的迁移途径或者特殊的分布模式？这为我们进一步研究该种内共生菌提供了新的信息和切入点。

总之，本研究表明日本弓背蚁颊下囊中的微生物种类和数量明显高于消化道，具有过滤和贮存来自食物、蚁巢和蚂蚁体表微生物的功能，可防止大量的微生物直接进入消化道，这也可能是日本弓背蚁消化道中细菌组成比较简单的主要原因。颊下囊中存在的优势微生物类群应该对贮存于其中的固体物质颗粒的消化利用和有害物质的抑制等发挥特殊的功能。颊下囊是在膜翅目昆虫口腔中普遍存在的一个特殊结构，但其功能至今仍然缺乏深入系统的研究，本文针对日本弓背蚁颊下囊微生物的研究仅仅是揭开了其神秘面纱的一角，期待更多的研究来揭

示颊下囊在蚂蚁社会生活中的潜在功能。

致谢 本研究得到西北农林科技大学资源环境学院薛泉宏教授的指导和帮助,特此感谢。

参考文献（References）

Bai L, Liu CX, Guo LF, Piao CY, Li ZL, Li JS, Jia FY, Wang XJ, Xiang WS, 2016. *Streptomyces formicae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the head of *Camponotus japonicus* Mayr. *Anton. Leeuw.*, 109(2): 253 – 261.

Bailey IW, 1920. Some relation between ants and fungi. *Ecology*, 1(3): 174 – 189.

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC, Júnior MB, Hebling MJA, Silva OA, 1997. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908. *Anton. Leeuw.*, 71(3): 243 – 248.

Duan JL, Xue QH, Shu ZM, Wang DS, He F, 2015. Effects of combined application of actinomycetes Act12 bio-control agents and potassium humate on growth and microbial flora in rooting zone of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Acta Ecol. Sin.*, 35(6): 1807 – 1819. [段佳丽, 薛泉宏, 舒志明, 王东胜, 何斐, 2015. 放线菌 Act12 与腐植酸钾配施对丹参生长及其根域微生态的影响. 生态学报, 35(6): 1807 – 1819]

Eelen D, Borgesen LW, Billen J, 2004. Morphology of a novel glandular epithelium lining the infrabuccal cavity in the ant *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera, Formicidae). *Arthropod Struct. Dev.*, 33(4): 471 – 475.

Eisner T, Happ GM, 1962. The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. *Psyche*, 69(3): 107 – 116.

Glancey BM, Vander Meer RK, Glover A, Lofgren CS, Vinson SB, 1981. Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invivta* Buren. *Insect Soc.*, 28(4): 395 – 401.

Guo LF, 2016. Diversity of Symbiotic Actinomycetes from *Camponotus japonicus* Mayr and Their Antibacterial Activity. MSc Thesis, Northeast Agricultural University, Harbin. [郭丽枫, 2016. 日本弓背蚁共生放线菌的多样性分析及抑菌活性研究. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文]

Han CY, Liu CX, Zhao JW, Guo LF, Lu C, Li JS, Jia FY, Wang XJ, Xiang WS, 2016. *Microbispora camponoti* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cuticle of *Camponotus japonicus* Mayr. *Anton. Leeuw.*, 109(2): 215 – 223.

Hansen LD, Spangenberg WJ, Gaver MM, 1999. Infrabuccal chamber of *Camponotus modoc* (Hymenoptera: Formicidae): ingestion, digestion, and survey of bacteria. In: Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests. Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic. 9: 211 – 219.

He H, Chen YY, Zhang YL, Wei C, 2011. Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. *Environ. Entomol.*, 40(6): 1405 – 1409.

He H, Wei C, Wheeler DE, 2014. The gut bacterial communities associated with lab-raised and field-collected ants of *Camponotus frailis* (Formicidae: Formicinae). *Curr. Microbiol.*, 69(3): 292 – 302.

Hölldober B, Wilson EO, 1990. The Ants. Cambridge University Press, Harvard. 1 – 10.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947 – 2948.

Li XP, Nan XN, Wei C, He H, 2012. The gut bacteria associated with *Camponotus japonicus* Mayr with culture-dependent and DGGE methods. *Curr. Microbiol.*, 65(5): 610 – 616.

Little AEF, Murakami T, Mueller UG, Currie CR, 2003. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 90(12): 558 – 562.

Little AEF, Murakami T, Mueller UG, Currie CR, 2006. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol. Lett.*, 2(1): 12 – 16.

Liu CX, Bai L, Ye L, Zhao JW, Yan K, Xiang WS, Wang XJ, 2016. *Nocardia lasii* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cuticle of an ant (*Lasius fuliginosus* L). *Anton. Leeuw.*, 109(11): 1513 – 1520.

Mankowski ME, Morrell JJ, 2004. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. *Mycologia*, 96(2): 226 – 231.

Moran MA, Torsvik VL, Torsvik T, Hodson RE, 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3): 915 – 918.

Mueller UG, Schultz TR, Currie CR, Adams RMM, Malloch D, 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Q. Rev. Biol.*, 76(2): 169 – 197.

Pagnocca FC, Rodrigues A, Nagamoto NS, Bacci M, 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Anton. Leeuw.*, 94(4): 517 – 526.

Pryce TM, Palladino S, Kay ID, Coombs GW, 2003. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Med. Mycol.*, 41(5): 369 – 381.

Quinlan RJ, Cherrett JM, 1978. Studies on role of infrabuccal pocket of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymformicidae). *Insect Soc.*, 25(3): 237 – 245.

Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M, Pagnoccaet FC, 2009. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Anton. Leeuw.*, 96(3): 331 – 342.

Schröder D, Deppisch H, Obermayer M, Krohne G, Stackebrandt E, Hölldobler B, Goebel W, Gross R, 1996. lntracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol. Microbiol.* 21(3): 479 – 489.

Seipke RF, Mario JB, Ruiz-Gonzalez X, Orivel J, Yu DW, Hutchings MI, 2012. Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with

antibiotic-producing actinobacteria. *Anton. Leeuw.*, 101(2): 443–447.

Shen J, 2012. Sophorolipids Biosynthesis by *Wickerhamiella domericqiae* from Medium-Chain Length Alkanes. MSc Thesis, Shandong University, Jinan. [申靖, 2012. 拟威克酵母利用中等碳链长度烷烃合成槐糖脂的研究. 济南: 山东大学硕士学位论文]

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.

Wu J, Wang CL, 1995. The Ants of China. China Forestry Publishing House, Beijing. [吴坚, 王长禄, 1995. 中国蚂蚁. 北京: 中国林业出版社]

Xu LH, Li WJ, Liu ZH, Jiang CL, 2007. Actinomycetes Systematics: Principles, Methods and Practices. Science Press, Beijing. [徐丽华, 李文均, 刘志恒, 姜成林, 2007. 放线菌系统学: 原理、方法及实践. 北京: 科学出版社]

Xu Y, Nan XN, Wei C, He H, 2016. Seasonal characteristics of gut bacterial communities associated with carpenter ant *Camponotus japonicus* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 632–640. [徐阳, 南小宁, 魏琮, 贺虹, 2016. 日本弓背蚁肠道细菌群落的季节特征. 昆虫学报, 59(6): 632–640]

Yu C, Liu CX, Wang XJ, Zhao JW, Yang LY, Gao RX, Zhang YJ, Xiang WS, 2013. *Streptomyces polyrhachii* sp. nov., a novel actinomycete isolated from an edible Chinese black ant (*Polyrhachis vicina* Roger). *Anton. Leeuw.*, 104(6): 1013–1019.

Zhang J, 2016. Ultrastructural of Infrabuccal Pocket of *Camponotus japonicus* Mayr and Bacterial Composition Associated with Its Content. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [张君, 2016. 日本弓背蚁颊下囊超微结构及其内含物中细菌的组成研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士论文]

Zhang J, Nan XN, Wei C, Wang YG, He H, 2016. Bacterial composition of the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* Mayr. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(1): 164–173. [张君, 南小宁, 魏琮, 王云果, 贺虹, 2016. 日本弓背蚁颊下囊内含物中细菌的组成研究. 应用昆虫学报, 53(1): 164–173]

Zhu ZL, Nan XN, Wang YG, He H, 2015. The isolation of anaerobic bacteria from the gut of *Camponotus japonicus*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(4): 1032–1039. [朱卓琳, 南小宁, 王云果, 贺虹, 2015. 日本弓背蚁消化道厌氧细菌的分离培养. 应用昆虫学报, 52(4): 1032–1039]

(责任编辑: 马丽萍)